

526,277

Rec'd PCT/PTO 10/526277
01 MAR 2005(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022779 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002936

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. September 2003 (01.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 40 746.0 1. September 2002 (01.09.2002) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHATZ, Philipp
[DE/DE]; Winsstrasse 41, 10405 Berlin (DE). SCHUS-
TER, Matthias [DE/DE]; Kastanienallee 107, 13158
Berlin (DE). BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg
4, 14532 Stahnsdorf (DE).(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin-Mitte (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des BerichtsZur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES BY MEANS OF CRACKABLE PROBE
MOLECULES(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON NUKLEINSÄURESEQUENZEN MITTELS SPALTBARER SON-
DENMOLEKÜLE(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting nucleic acid sequences, which is characterized by the fact that the
following steps are carried out: a) at least one nucleic acid is bound onto a solid phase; b) probe molecules which are provided with
a crackable bond and a probe molecule-specific mass marker are hybridized in a sequence-specific manner to the nucleic acid; c)
the probe molecules that are not hybridized are removed; d) the hybridized probe molecules are brought into contact with a matrix
which cracks said crackable bonds and is used as a matrix in a MALDI mass spectrometer; e) the mass markers are detected in the
positions in which the nucleic acid is bound.(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen, dadurch
gekennzeichnet, dass folgende Schritte ausgeführt werden: a) mindestens eine Nukleinsäure wird auf einer Festphase gebunden;
b) Sonden-moleküle werden sequenzspezifisch an die Nukleinsäure hybridisiert, wobei die Sonden-moleküle mit ei-ner spaltbaren
Bindung und einer Massenmarkierung verse-hen sind, welche für das Sonden-molekül spezifisch ist; c) Entfernung der nicht hybri-
disierten Sonden-moleküle; d) Kontaktieren der hybridisierten Sonden-moleküle mit ei-ner Matrix, die besagte spaltbaren Bindungen
spaltet und zugleich als Matrix in einem MALDI-Massenspektrometer dient; e) Nachweis der Massenmarkierung an den Positionen,
an denen die Nukleinsäure gebunden wurde.

WO 2004/022779 A2

**Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mittels
spaltbarer Sondenmoleküle**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum
Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in Nukleinsäuren.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre
in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebe-
10 nen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in
RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe
der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschal-
tet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Ge-
ne in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist
15 mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw.
des Genoms korrelierbar.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte
Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt bei-
20 spielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkripti-
on, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese.
Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil
genetischer Information ist daher von erheblichem Inte-
resse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht
25 durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-
Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist
wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-
Amplifikation die epigenetische Information, welche die
5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

30 Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten an-
gewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-
Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von
Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer
35 Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem
Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-

Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällung- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dörfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov.;17(3):275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalvo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2529-31, WO-A 95/00669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO-A 99/28498).

Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als Methyl-Light bekannt geworden ist (WO-A 00/70090). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Produkte erübrigt.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Für die Markierung von Amplifikaten sind vielfach massenmarkierte Oligonukleotide verwendet worden (www.quiagenomics.com), die einfach herzustellen sind und nicht fragmentieren.

5

Als Massenmarkierungen werden z.B. Tritylgruppen mit verschiedenen Massen verwendet (Shchepinov, M.S., Southern E.M. Trityl mass-tags for encoding in combinatorial oligonucleotide synthesis (1999), Nucleic Acids Symposium Series 42: 107-108)

10

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct. 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere. Die Flugzeit wird in die Masse der Ionen umgerechnet.

15

20

25

30

35

Technische Neuerungen der Hardware haben die Methode signifikant verbessert. Erwähnenswert ist hierbei die „delayed extraction“-Methode (DE). Für DE wird die Beschleunigungsspannung mit einer Verzögerung zum Laserpuls eingeschaltet und dadurch eine verbesserte Auflösung der Signale erreicht, weil die Zahl der Stöße verringert wird.

MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird.

Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren. PNAs und Methylphosphonatoligonukleotide sind mit MALDI untersucht worden und lassen sich so analysieren.

Derzeit ist diese Technologie in der Lage, im Massenbereich von 1.000 bis 4.000 Da, Moleküle mit einer Massendifferenz von 1 Da zu unterscheiden. Durch die natürliche Verteilung von Isotopen sind die meisten Biomoleküle jedoch schon etwa 5 Da breit. Technisch ist diese massenspektrometrische Methode also vorzüglich für die Analyse von Biomolekülen geeignet. Vernünftigerweise müssen zu analysierende Produkte, die unterschieden werden sollen, also mindestens 5 Da auseinander liegen. In diesem Massenbereich könnten also 600 Moleküle unterschieden werden.

Als Sondenmoleküle sind in der Literatur neben DNA auch PNA und LNA vielfach beschrieben worden. Bei der PNA handelt es sich um ein synthetisches Nukleinsäureanalog, wo das Zucker-Phosphat Rückgrat ersetzt ist durch ein Peptid ähnliches Polyamid. Anstelle von 5'- und 3'-Enden haben PNAs N- und C-Enden. Wie die LNAs (Locked Nucleic Acids) (siehe www.cureon.com/technology/aboutlna) verfügen die PNAs über eine hohe Stabilität gegenüber Nukleasen und eine hohe Bindungsaffinität gegenüber komplementärer DNA.

Beschrieben sind photospaltbare Bausteine für MALDI-TOF-Messungen, die eine lichtgesteuerte Freisetzung der Proben erlauben (Olejnik et al., 1998, Nucleic Acids Res., 3572-3576). Koster et al. (WO-A 98/20166) schlugen die Verwendung von spaltbaren Bindungen vor. Dazu sind Primeroligonukleotide immobilisiert worden, die dann mit genomischer DNA hybridisiert wurden. Nach der anschließenden Extensionsreaktion wurden die entstandenen Produkte spezifisch von der Oberfläche gespalten und massenspektrometrisch analysiert. Wiederum ähnlich wurde die Verwendung von photolytisch spaltbaren Oligonukleotidsonden auf einem Array vorgeschlagen (Jäschke, A., Hausch, F. EP1138782), wobei eine Multiplex Sequenzabhängige Modifi-

kation der Oligonukleotidsonden durchgeführt wird und die Massen der modifizierten Sonden direkt auf dem Array gemessen werden. Das Gemisch der Zielsequenzen wird dabei durch die definierten Positionen der Sonden auf dem Array
5 getrennt.

Matrixinduzierte Fragmentierung von P3'-N5' Phosphoramidat enthaltende DNA ist in der Literatur beschrieben (Shchepinov, M., Denissenko, M., 2001, Nucleic Acids
10 Res., 3864-3872). Dabei kann die P-N Bindung unter sauren Bedingungen gespalten werden.

Aufgabenstellung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung
15 eines Verfahrens zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen. Dazu sollen Sondenmoleküle sequenzspezifisch an eine oder mehrere Festphasen immobilisierte Nukleinsäuren hybridisiert werden. Diese Sondenmoleküle sollen mit einer
20 spaltbaren Bindung und einer spezifischen Massenmarkierung versehen werden. Anschließend sollen die hybridisierten Sondenmoleküle mit einer Substanz oder einem Substanzgemisch kontaktiert werden, die die spaltbaren Bindungen spaltet und zugleich als Matrix in einem MALDI-Massenspektrometer dient. Die Massenmarkierungen sollen
25 abschließend an den Positionen auf der Festphase nachgewiesen werden, an denen die Nukleinsäuren gebunden wurden.

Beschreibung der Erfindung

30 Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen. Dieses Verfahren ist durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

Im ersten Schritt des Verfahrens wird mindestens eine
35 Nukleinsäureprobe auf einer Festphase gebunden. Die Sondenmoleküle werden im nächsten Schritt sequenzspezifisch

an die Nukleinsäureprobe hybridisiert, wobei die Sonden-
moleküle mit einer spaltbaren Bindung und einer Massen-
markierung versehen sind, welche für das Sondenmolekül
spezifisch ist. Anschließend werden die nicht hybridi-
5 sierten Sondenmoleküle entfernt. In einem weiteren
Schritt des Verfahrens werden die hybridisierten Sonden-
moleküle mit einer Matrix kontaktiert, die die spaltbaren
Bindungen spaltet und zugleich als Matrix in einem MALDI-
Massenspektrometer dient. Die Massenmarkierung werden im
10 letzten Schritt des Verfahrens an den Positionen nachge-
wiesen, an denen die Nukleinsäureprobe gebunden wurde.

Im folgenden ist dieses Verfahren detailliert beschrie-
ben:

15 Eine Nukleinsäure wird bevorzugt aus Zelllinien, Blut,
Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in
Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von
Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust
oder Leber, histologischen Objektträgern oder allen mög-
20 lichen Kombinationen hiervon erhalten.

Die Nukleinsäure wird amplifiziert, wobei dies bevorzugt
mittels enzymatischer Primerverlängerung, PCR, Rolling
Circle Amplifikation, Ligase-Kettenreaktion oder anderen
25 Verfahren erfolgt.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird
die Amplifikation mehrerer unterschiedlicher Fragmente in
einem Reaktionsgefäß durchgeführt.

30 Auf einer Festphase, die vorzugsweise auch als Probenträ-
ger eines Massenspektrometers dienen kann, wird mindes-
tens eine Nukleinsäure gebunden. Die Festphase oder Fest-
phasenoberfläche besteht besonders bevorzugt aus nicht-
35 leitenden Materialien wie beispielsweise Glas. Besonders
bevorzugt sind ferner leitende Materialien wie beispiels-

weise Teflon, Silizium oder Black Conductive Polypropylen. Bevorzugt sind auch weitere Materialien wie Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

5

Erfindungsgemäß kann die Bindung der Nukleinsäure an die Oberfläche sowohl kovalent (z.B. durch einen Primer, der am 5'-Ende ein Thiol trägt und an eine mit Bromessigsäure aktivierte Oberfläche gebunden wird) als auch nichtkovalent durch van der Waals Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen (z.B. durch Hitzeimmobilisierung oder Inkubation) erfolgen.

10

15

Bevorzugt sind mehrere Nukleinsäuren auf einer Festphasenoberfläche in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Rasters angeordnet. Alternativ bevorzugt ist es, dass auf einer Mehrzahl von Oberflächen jeweils zumindest eine Nukleinsäure angeordnet ist. Diese Festphasen können besonders bevorzugt in den Probenträger eines MALDI-Massenspektrometers eingesetzt werden.

20

Bei den nachzuweisenden Nukleinsäuren handelt es sich bevorzugt um DNA-Sequenzen und insbesondere zwischen unterschiedlichen Proben veränderliche Sequenzen, die SNPs, Punktmutationen, Deletionen, Inversionen oder Insertionen enthalten. Besonders bevorzugt sind die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen chemisch vorbehandelte DNA-Sequenzen, welche zum Nachweis von DNA-Methylierung an bestimmten CpG Positionen dienen.

25

30

Besonders bevorzugt führt man die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durch. Dabei werden alle nicht im Kontext CpG vorhandenen Cytosine in Thymin umgewandelt, wodurch die Untersuchung individueller CpG Positionen ermöglicht wird.

35

Bevorzugt erfolgt die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose. Ebenfalls bevorzugt ist es, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.

5

Die für die Bindung an nachzuweisende Nukleinsäuren erforderlichen Sondenmoleküle werden im Stand der Technik oft kombinatorisch in Form von Bibliotheken hergestellt (EP1036202), die auch in dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt Anwendung finden.

10

Besonders bevorzugt werden die Sondenmoleküle mit einer spaltbaren Bindung und einer Massenmarkierung versehen, welche für das jeweilige Sondenmolekül spezifisch ist.

15

Solche Markierungen können beispielsweise 6-Triethylammoniumhexyryl-, 6-Trimethylammoniumhexyryl- oder säurelabile Monomethoxytrityl- oder 4-Methyltritylschutzgruppen sein.

20

Die Masse einer Markierung unterscheidet sich vorzugsweise jeweils von der Masse aller anderen in einem Experiment verwendeten Markierungen um mindestens 1 Da. Die Sondenmoleküle umfassen bevorzugt mindestens ein CG, TG oder CA Dinukleotid.

25

Die unterschiedliche Masse kann besonders bevorzugt auch Resultat einer enzymatischen Reaktion sein. Hierbei wird die Sonde mit einer Massenmarkierung synthetisiert und anschließend enzymatisch modifiziert, wobei sich die Masse ändert.

30

Die Massenmarkierung wird besonders bevorzugt erst infolge einer enzymatischen Modifikation mit dem Sondenmolekül verbunden. In diesem Fall wird die Sonde chemisch ohne Massenmarkierung hergestellt und anschließend enzymatisch mit einer Massenmarkierung versehen.

35

Bevorzugt wird die Sonde chemisch mit einer Massenmarkierung versehen und nicht enzymatisch verändert. Darüber hinaus ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die mit einer Massenmarkierung versehene Sonde chemisch verändert wird. Das kann beispielsweise durch Säure erfolgen oder mit einer Behandlung nach Maxam und Gilbert.

Diese Sondenmoleküle, die besonders bevorzugt aus DNA oder modifizierter DNA bestehen, werden sequenzspezifisch an die Nukleinsäuren hybridisiert. Bevorzugt sind die Sondenmoleküle RNA, LNA, PNA oder entsprechende Hybride davon, auch mit DNA oder modifizierter DNA kombiniert. Die nicht hybridisierten Sondenmoleküle werden entfernt. Die verbleibenden hybridisierten Sondenmoleküle werden vorzugsweise nach der Hybridisierung enzymatisch durch Primerverlängerung oder Ligation modifiziert. Als Enzyme für die Primerverlängerung kommen beispielsweise Thermosequenase oder Taq-Polymerase in Frage, wohingegen für die Ligation beispielsweise Ampligase DNA Ligase, Pfu oder Taq DNA Ligase Anwendung finden.

Bevorzugt erfolgt die Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Sondenmolekülen mit jeweils mindestens einem Mitglied, wobei die Sondenmoleküle der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Sondenmoleküle der zweiten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge.

Bevorzugt erfolgt eine Hybridisierung an zwei Klassen von Sondenmolekülen mit jeweils mindestens einem Mitglied,

wobei die Sondenmoleküle der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von der Methylierung besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

Bevorzugt erfolgt eine Hybridisierung an zwei Klassen von Sondenmolekülen mit jeweils mindestens einem Mitglied, wobei die Sondenmoleküle der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von der Methylierung besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

Anschließend werden die nicht hybridisierten Sondenmoleküle entfernt.

Die hybridisierten Sondenmoleküle werden mit einer Matrix kontaktiert (z.B. durch sprühen, pipettieren, spotten), die die spaltbaren Bindungen spaltet und zugleich als Matrix in einem MALDI-Massenspektrometer dient. Dazu kommt beispielsweise eine 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon (THA) Matrix oder 3-HPA (3-Hydroxypicolinsäure) Matrix in Frage, wobei die THA Matrix erfindungsgemäß mit verdünn-

ter Säure wie TFA (Trifluoressigsäure) versetzt wird.
Durch die Größe des Oligonukleotidspaltprodukts kann die
Detektionsgrenze entscheidend herabgesetzt werden. Bei-
spiele für säureabspaltbare Schutzgruppen sind Monometho-
5 xytrityl oder 4-Methyltrityl.

Die Spaltung der Oligonukleotide kann auch strukturspezi-
fisch durch Zugabe einer Flap-Endonuklease wie Cleavage
VIII erfolgen. Weiter können Endonukleasen zur Spaltung
10 eingesetzt werden, die die Sonde aus der Mitte heraus
spalten wie beispielsweise Mung Bean Nuklease oder T7 En-
donuklease I. Weiter ist der Einsatz von sequenzspezifi-
schen Endonukleasen zur Spaltung möglich, beispielsweise
können dafür die Enzyme Tsp 509I oder MseI eingesetzt
15 werden. Darüber hinaus ist der Verdau mit einer 3'-
Endonuklease möglich, bevorzugt nach Zugabe saurer Mat-
rix. Ferner werden Exonukleasen zur Spaltung eingesetzt.
Eine 3'-5'-Exonuklease wie beispielsweise Exonuklease I
spaltet die einzelsträngige Sonde vom 3'-Ende her bis zu
20 einer Modifikation (z. B. Phosphothioat). Eine 5'-3'-
Exonuklease wie beispielsweise T7 Exonuklease spaltet
entsprechend die einzelsträngige Sonde vom 5'-Ende her
bis zu einer Modifikation.

25 Die Massenmarkierungen werden an denjenigen Positionen
nachgewiesen, an denen die Nukleinsäure gebunden wurde.
Besonders bevorzugt erfolgt dieser Nachweis mittels
MALDI-TOF Massenspektrometrie. Durch die bevorzugte La-
dung der Massenmarkierung von einfach positiv oder ein-
30 fach negativ wird die Detektionsgrenze entscheidend her-
abgesetzt.

Das vorstehend beschriebene Verfahrens wird vorzugsweise
verwendet zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Er-
35 eignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese
nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden

Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Das vorstehend beschriebene Verfahrens wird vorzugsweise verwendet zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Bevorzugt ist auch ein Kit, umfassend eine Festphase zur Immobilisierung der Nukleinsäure, Sondenmolekülen, Komponenten für die Durchführung der massenspektrometrischen Messung sowie eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens.

Die folgenden Beispiele erläutern das erfindungsgemäße Verfahren:

Durchführung der Methylierungsanalyse im Gen MDR1 mittels einer spaltbaren Sonde

Beispiel: Anbindung der Zielsequenz an die Festphase

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte Nukleinsäure mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschließend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die Nukleinsäure in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Die PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) durchgeführt. Es wurden für einen 100 µl Ansatz 40 ng DNA, 0.07µmol/l von jedem Primeroligonukleotid 1 mmol/l dNTPs und vier Einheiten HotstarTaq eingesetzt. Die übrigen Bedingungen wurden gemäß Herstellerangaben gewählt. Für die PCR wurde zuerst eine Denaturierung für 15 Minuten bei 96 °C durchgeführt, danach 40 Zyklen (60 Sekunden bei 96°C, 75 Sekunden bei 56 °C und 75 Sekunden bei 65 °C) und eine abschließenden El Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschließend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die Nukleinsäure in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Die PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) durchgeführt. Es wurden für einen 100 µl Ansatz 40 ng DNA, 0.07µmol/l von jedem Primeroli-

gonukleotid 1 mM dNTPs und vier Einheiten HotstarTaq eingesetzt. Die übrigen Bedingungen wurden gemäß Herstellerangaben gewählt. Für die PCR wurde zuerst eine Denaturierung für 15 Minuten bei 96 °C durchgeführt, danach 40
5 Zyklen (60 Sekunden bei 96°C, 75 Sekunden bei 56 °C und 75 Sekunden bei 65 °C) und eine abschließenden Elongation von 10 Minuten bei 72 °C. Das Vorhandensein der PCR Produkte wurde auf Agarosegelen überprüft. Einer der beiden
10 Primeroligonukleotide war an seinem 5'-Ende Thiol (im folgenden Beispiel 8 stattdessen 5'-Ende Phosphat) modifiziert.

Im vorliegenden Fall werden Cytosine aus der potentiellen Promotorregion des Gens MDR1 untersucht. Mit Sequenzen
15 dieses Gens kann die Reaktion eines Patienten auf eine Chemotherapie verfolgt werden. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden SH-TAA GTA TGT TGA AGA AAG ATT ATT GTA G (Seq. ID 1.) und CGC ATC AAC TAA ATC ATT
20 AAA A (Seq. ID 2.) ein definiertes Fragment der Länge 242 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat wird mit seiner Thiol Modifizierung an einer Bromessigsäure behandelten Polylysin Festphase gebunden. Polylysinbeschichtete Glasobjektträger werden vorher in Ultraschall gereinigt und 1 h in
25 20 mmol/l Bromessigsäure, 20 mmol/l Dicyclohexylcarbodiimid, 2 mmol/l 4-(Dimethylamino)pyridin-Lösung aktiviert. Die Bindung mit dem PCR-Produkt erfolgt in einer 0,18 mol/l Triscarboxyethylphosphin, 200 mmol/l NaH₂PO₄ Pufferlösung 2h in einer 25°C warmen feuchten Kammer. Die
30 PCR-Produkte werden mit 0,05 mol/l NaOH denaturiert und dann analysiert.

Beispiel 1:

Das einzelsträngige PCR-Produkt wurde mit einem Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Dazu wurden säurelabile modifizierte Oligonukleotide verwendet: 5'-TAT AAA CAC GTC TTT CapnA-Amino-3'

35

(Seq. ID 3.) oder 5'-TAT AAA CAC ATC TTT CapnA-Amino-3' (Seq. ID 4.) wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 198 des Amplifikats befindet. Bei dem Adenosin an der vorletzten Position beider Oligonukleotide handelt es sich um ein 5'Amino-Adenosin, welches durch Säure leicht hydrolysiert wird. An die Aminofunktion am 3'-Ende wird vorher ein 6-Triethylammoniumhexyryl-N-hydroxysuccinimidylester (199 Da) (CT1), bzw. ein 6-Trimethylammoniumhexyryl-N-hydroxysuccinimidylester (129 Da) (CT2) gekoppelt. Dadurch unterscheiden sich die Massen der beiden kleineren Spaltprodukte um 70 Da. Das methylierte Cytosin wird mit dem Oligonukleotid (Seq. ID 3.) nachgewiesen, wogegen die unmethylierte Zustandsform, die durch ein Thymin repräsentiert wird, mit dem Oligonukleotid (Seq. ID 4.) nachgewiesen wird. Beide Oligonukleotide hybridisieren an dem jeweils komplementären Strang. Durch Aufbringen von 350 mmol/l 3-HPA in Acetonitril mit 1,5% Trifluoressigsäure wird die säurelabile Spaltstelle hydrolysiert. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf dem Nachweis der Masse der Spaltprodukte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Durch die Größe des Oligonukleotidspaltproduktes und die definierte Ladung von einfach positiv wird die Nachweisgrenze entscheidend herabgesetzt. Nur wenn in der Bisulfite behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit der Sonde (Seq. ID3., Seq. ID 4.). Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt und damit über die detektierte Masse. Durch den Einbau der PN-Bindung direkt am 3'-Ende hat man zusätzlich den Vorteil eine nicht geladene Massenmarkierung verwenden zu können. Zum Beispiel lässt sich dann ein Peptid ankoppeln.

Beispiel 2:

Das einzelsträngige PCR-Produkt wurde mit einem Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Dazu wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet:

5 5'Amino-TAT AAA CAC GTC TTT CAA (Seq. ID 5.) oder
5'Amino-TAT AAA CAC ATC TTT CAA (Seq. ID 6.) An die Aminofunktion am 5'-Ende wird vorher ein 6-Triethylammoniumhexyryl-N-hydroxysuccinimidylester (199 Da) (CT1), bzw. ein 6-Trimethylammoniumhexyryl-N-hydroxysuccinimidylester (129 Da) (CT2) gekoppelt. Dadurch unterscheiden sich die Massen der beiden kleineren Spaltprodukte um 70 Da. Das methylierte Cytosin wird mit dem Oligonukleotid (Seq. ID 5.) nachgewiesen, wogegen die unmethylierte Zustandsform, die durch ein Thymin repräsentiert wird, mit dem Oligonukleotid (Seq. ID 6.) nachgewiesen wird. Beide Oligonukleotide hybridisieren an dem jeweils komplementären Strang. Die Oligonukleotide werden dann einer Behandlung nach Maxam und Gilbert unterzogen. Durch das Aufbringen von Dimethylsulfat und Erhitzen im alkalischen pH werden alle Adenosine und Guanosine gespalten. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf dem Nachweis der Masse der Spaltprodukte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. In diesem Fall beobachtet man eine Masse von (498 Da + 199 Da(CT1 + dT), bzw. + 129 Da(CT2 + dT)) 697, bzw. 627 Da. Durch die Größe des Oligonukleotidspaltproduktes wird die Detektionsgrenze entscheidend herabgesetzt. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit der Sonde (Seq. ID 5., Seq. ID 6.). Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt und damit über die detektierte Masse. Spaltet man die Cytosine und Thymidine mit Hydrazin und Piperidin kann anschließend ein 3'-modifiziertes Oligonukleotidpärchen untersucht werden. Als Spaltprodukte ergäben

sich in diesem Fall dAdA-CT1 und dAdA-CT2. Alle denkbaren Spaltprodukte sind jedoch mehrfach geladen.

Beispiel 3:

Das einzelsträngige PCR-Produkt wurde mit einem Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Dazu wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet:

5'-Amino-TAT AAA CAC GTC TTT CAA (Seq. ID 7.) oder 5'-Amino-5'-TAT AAA CAC ATC TTT CAA (Seq. ID 8.) An die Aminofunktion am 5'-Ende wird vorher eine säureabspaltbare Schutzgruppe wie 4-Methyltrityl (258 Da), bzw. Monomethoxytrityl (289 Da) gekoppelt. Dadurch unterscheiden sich die Massen der beiden kleineren Spaltprodukte um 14 Da.

Das methylierte Cytosin wird mit dem Oligonukleotid (Seq. ID 7.) nachgewiesen, wogegen die unmethylierte Zustandsform, die durch ein Thymin repräsentiert wird, mit dem Oligonukleotid (Seq. ID 8.) nachgewiesen wird. Beide Oligonukleotide hybridisieren an dem jeweils komplementären Strang. Die Oligonukleotide werden mit einer säurehaltigen 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon Matrix überdeckt und im MALDI-TOF vermessen. Dabei werden die Oligonukleotide von ihren Massenmarkierungen getrennt. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf dem Nachweis der Masse der Schutzgruppe mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Durch die Größe der Schutzgruppe und die definierte Ladung von +1 wird die Detektionsgrenze entscheidend herabgesetzt. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit der Sonde (Seq. ID 7., Seq. ID 8.). Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt und damit über die detektierte Masse.

Beispiel 4:

Das einzelsträngige PCR-Produkt wurde mit einem Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Dazu wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet:

5 5'-AminoTmptAT AAA CAC GTC TTT CAA-3' (Seq. ID 9.) oder
5'-AminoTmptAT AAA CAC ATC TTT CAA-3' (Seq. ID 10.). Das
mpt ist ein Methylphosphonat. An die Aminofunktion am 5'-
Ende wird vorher ein 6-Triethylammoniumhexyryl-N-
hydroxysuccinimidylester (199 Da) (CT1), bzw. ein 6-
10 Trimethylammoniumhexyryl-N-hydroxysuccinimidylester (129
Da) (CT2) gekoppelt. Dadurch unterscheiden sich die Mas-
sen der beiden kleineren Spaltprodukte um 70 Da. Das me-
thylierte Cytosin wird mit dem Oligonukleotid (Seq. ID
9.) nachgewiesen, wogegen die unmethylierte Zustandsform,
15 die durch ein Thymin repräsentiert wird, mit dem Oligo-
nukleotid (Seq. ID 10.) nachgewiesen wird. Beide Oligo-
nukleotide hybridisieren an dem jeweils komplementären
Strang. Die Oligonukleotide werden mit einer 3'-
Endoglykosidase verdaut. Der Nachweis des Hybridisie-
20 rungsprodukts beruht auf dem Nachweis der Masse des
verbleibenden dT und des charge tags mittels MALDI-TOF
Massenspektrometrie. Durch die Größe der Massenmarkierung
und die definierte Ladung von -1 wird die Detektionsgren-
ze entscheidend herabgesetzt. Nur wenn in der Bisulfit
25 behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin
vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion
der amplifizierten DNA mit der Sonde (Seq. ID 9., Seq. ID
10.). Somit entscheidet der Methylierungsstatus des je-
weiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisie-
30 rungsprodukt und damit über die detektierte Masse. Man
kann das Methylphosphonat auch ganz ans 3'-Ende des Oli-
gonukleotids setzten und erhält dann auch ohne charge tag
ein einfach negativ geladenes Molekül.

35 Beispiel 5:

Das einzelsträngige PCR-Produkt wurde mit zwei in der Sequenz auf einander folgende Oligonukleotide unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Dazu wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet:

5'-TTC AAC TTA TAT AAA CAmpC-3' (Seq. ID 11.) und
5'TmtpTC TTT CAA AAT TCA CAT-3' (Seq. ID 12.) oder
5'GmtpTC TTT CAA AAT TCA CAT-3' (Seq. ID 13.) Die Abkürzung mtp steht für Methylphosphonat. Das methylierte Cytosin wird durch die Ligation von Seq. ID 11. und Seq. ID 12. nachgewiesen, wogegen die unmethylierte Zustandsform, die durch ein Thymin repräsentiert wird, durch die Ligation von Seq. ID 11 und Seq. ID 13 nachgewiesen wird. Beide Oligonukleotide hybridisieren an dem jeweils komplementären Strang. Die Oligonukleotide werden durch 3'-Endoglykosidase und 5'Endoglykosidase verdaut. Der Nachweis des Ligationsprodukts beruht auf dem Nachweis der Masse der verbleibenden Nukleotide (AmpCp-TmtpC oder AmpCp-TmtpC) mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Durch die Größe der Produkte und die definierte Ladung von einfach negativ wird die Detektionsgrenze entscheidend herabgesetzt. Durch weitere Methylphosphonate kann die Masse weiter verschoben werden.

Beispiel 6:

Das einzelsträngige PCR-Produkt wurde mit zwei in der Sequenz auf einander folgende Oligonukleotide unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Dazu wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet:

5'-TTC AAC TTA TAT AAA CApnc-3' (Seq. ID 14.) und
5'ATmtpC TTT CAA AAT TCA CAT-3' (Seq. ID 15.) oder
5'GmtpTC TTT CAA AAT TCA CAT -3' (Seq. ID 16.) Die Abkürzung mtp steht hier für Methylphosphonat. Das methylierte Cytosin wird durch die Ligation von Seq. ID 14. und Seq. ID 15. nachgewiesen, wogegen die unmethylierte Zustandsform, die durch ein Thymin repräsentiert wird, durch die Ligation von Seq. ID 14 und Seq. ID 15 nachgewiesen wird.

Beide Oligonukleotide hybridisieren an dem jeweils komplementären Strang. Die Oligonukleotide werden durch Zugabe saurer 3-HPA (3-Hydroxypicolinsäure) Matrix mit 0,3% TFA (Trifluoressigsäure) und Verdau mit einer 3'-

5 Endoglykosidase verdaut. Der Nachweis des Ligationsprodukts beruht auf dem Nachweis der Masse der verbleibenden Nukleotide (NH₃⁺-Cp-Ap-TmtpC oder NH₃⁺-Cp-Gp-TmtpC) mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Durch die Größe der Produkte und die definierte Ladung von einfach negativ
10 wird die Detektionsgrenze entscheidend herabgesetzt. Anstelle des Methylphosphonates kann man im zweiten Oligonukleotid an der zweiten Position am 5'-Ende auch eine NP(Stickstoff-Phosphor)-Bindung, also ein 3'Amino-Guaonsid bzw. 3'Amino-Thymidin. Es entsteht ein NH₃⁺-Cp-
15 ANH₃⁺.

Beispiel 7:

Das einzelsträngige PCR-Produkt wurde mit zwei in der Sequenz aufeinander folgende Oligonukleotide unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Die beiden Oligonukleotide überlappen sich. Dazu wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet:

5'-TTC AAC TTA TAT AAA CAC-3' (Seq. ID 17.) und 5'Amino-CATC TTT CAA AAT TCA CAT-3' (Seq. ID 18.) oder 5'Amino-
25 CGTC TTT CAA AAT TCA CAT-3' (Seq. ID 19.). An die Aminofunktion am 5'-Ende wird vorher ein 6-Triethylammoniumhexyryl-N-hydroxysuccinimidylester (199 Da) (CT1), bzw. ein 6-Trimethylammoniumhexansäure-N-hydroxysuccinimidylester (129 Da) (CT2) gekoppelt. Das
30 methylierte Cytosin wird durch die Ligation von Seq. ID 17. und Seq. ID 18. nachgewiesen, wogegen die unmethylierte Zustandsform, die durch ein Thymin repräsentiert wird, durch die Ligation von Seq. ID 18 und Seq. ID 19 nachgewiesen wird. Beide Oligonukleotide hybridisieren an
35 dem jeweils komplementären Strang. Die Oligonukleotide werden durch Zugabe einer Flap-Endonuklease (Clevase VIII

Endonuklease) gespalten. Der Nachweis des Ligationsprodukts beruht auf dem Nachweis der Masse der verbleibenden Nukleotide (CT1 + dC oder CT2 + dC) mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Durch die Größe der Produkte und die definierte Ladung von einfach negativ wird die Detektionsgrenze entscheidend herabgesetzt.

Beispiel 8:

Hier wurde mit den spezifischen Primeroligonukleotiden TAA GTA TGT TGA AGA AAG ATT ATT GTA G und Phosphat-CGC ATC AAC TAA ATC ATT AAA A ein definiertes Fragment der Länge 242 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat wurde mit lambda-Exonuklease verdaut, so dass der 5'-Phosphat modifizierte Strang abgedaut wurde und nur noch ssDNA (ss=single stranded) vorlag. Diese wurde nun an ein Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-Phosphat-TC TTT CAA AAT TCA CAT-Amino-3' (Seq. ID 20) unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert. Dieses Oligonukleotid ist über seine 3'-Aminomodifikation an eine aktivierte Oberfläche gebunden. Dann wurde ein Ligationsmix hinzugefügt, der Ligase, Ligasepuffer und eines der folgenden zwei Oligonukleotide enthielt: 5'-DMT-ACT-3' (Seq. ID 21) oder 5'-MMT-ACG-3' (Seq. ID 22) (DMT=Dimethyltrityl, MMT=Monomethyltrityl). Das methylierte Cytosin wurde durch die Ligation von Seq. ID 20 und Seq. ID 21 nachgewiesen. Dabei wurde die Tritylgruppe durch die Zugabe von saurer Matrix abgespalten und deren Masse im Massenspektrometer analysiert. Bei einer unmethylierten Probe wurde während der Bisulfitreaktion ein T anstelle eines C eingebaut, die Sequenz ID 22 ligiert und durch ihre MMT-Gruppe nachgewiesen. Durch die Verwendung weiterer Tritylgruppen können alle möglichen CpG Positionen in der beschriebenen Ligasereaktion untersucht werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen, da-
5 durch gekennzeichnet, dass folgende Schritte ausge-
führt werden:
- a) mindestens eine Nukleinsäure wird auf einer Fest-
phase gebunden;
- 10 b) Sondenmoleküle werden sequenzspezifisch an die
Nukleinsäure hybridisiert, wobei die Sondenmoleküle
mit einer spaltbaren Bindung und einer Massenmarkie-
rung versehen sind, welche für das Sondenmolekül spe-
15 zifisch ist;
- c) Entfernung der nicht hybridisierten Sondenmolekü-
le;
- 20 d) Kontaktieren der hybridisierten Sondenmoleküle mit
einer Matrix, die besagte spaltbaren Bindungen spal-
tet und zugleich als Matrix in einem MALDI-
Massenspektrometer dient;
- 25 e) Nachweis der Massenmarkierung an den Positionen,
an denen die Nukleinsäure gebunden wurde.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
30 dass die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen DNA-
Sequenzen und insbesondere zwischen unterschiedlichen
Nukleinsäuren veränderliche Sequenzen sind, die SNPs,
Punktmutationen, Deletionen, Inversionen oder Inser-
tionen enthalten.
- 35 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen che-

misch vorbehandelte DNA-Sequenzen sind und insbesondere mit Bisulfit behandelte Sequenzen, welche zum Nachweis von DNA-Methylierung an bestimmten CpG Positionen dienen.

5

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure vor der Bindung an die Festphase amplifiziert wird, wobei dies bevorzugt mittels enzymatischer Primerverlängerung, PCR, Rolling Circle Amplifikation, Ligase-Kettenreaktion oder anderen Verfahren erfolgen kann.

10

5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase der Proben-träger eines Massenspektrometers ist.

15

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

20

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase in den Probenträger eines MALDI-Massenspektrometers eingesetzt werden kann.

25

8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Nukleinsäuren auf der Festphasenoberfläche in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Rasters angeordnet sind.

30

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle DNA oder modifizierte DNA sind.

35

10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle LNA, PNA oder entsprechende Hybride davon, auch mit DNA oder modifizierter DNA, sind.
- 5
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle nach der Hybridisierung enzymatisch durch Primerverlängerung modifiziert werden.
- 10
12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle nach der Hybridisierung enzymatisch durch Ligation modifiziert werden.
- 15
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Massenmarkierung erst infolge der enzymatischen Modifikation mit dem Sondenmolekül verbunden ist.
- 20
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Massenmarkierung eine einzelne positive oder eine einzelne negative Ladung trägt.
- 25
15. Verfahren nach einem voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Massen einer Markierung sich jeweils von der Masse aller anderen in einem Experiment verwendeten Markierung um mindestens 1 Da unterscheidet.
- 30
16. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle mindestens ein CG, TG oder CA Dinukleotid umfassen.
- 35
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Sondenmole-

külen mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Sondenmoleküle der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Sondenmoleküle der zweiten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) eine Hybridisierung an zwei Klassen von Sondenmolekülen mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Sondenmoleküle der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von der Methylierung besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) eine Hybridisierung an zwei Klassen von Sondenmolekülen mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Sondenmoleküle der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert

vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn ein zu untersuchendes Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von der Methylierung besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäure aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern oder allen möglichen Kombinationen hiervon erhalten wurde.

21. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des

Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

5 22. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

10 23. Kit, umfassend ein Festphase zur Immobilisierung der Nukleinsäure, Sondenmolekülen sowie Komponenten für die Durchführung der massenspektrometrischen Messung sowie eine Anleitung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche.

15